



УДК 616-002.2, 57.088.1

DOI 10.17802/2306-1278-2020-9-2-45-52

СОВРЕМЕННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ В КЛИНИКЕ МОНОМЕРА С-РЕАКТИВНОГО БЕЛКА

М.Д. Зверева ✉, О.С. Сабурова, И.С. Мельников, С.Г. Козлов, З.А. Габбасов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. 3-я Черепковская, 15а, Москва, Российская Федерация, 121552

Основные положения

- Разработана уникальная мультиплексная тест-система, позволяющая определять уровни как нативной, так и мономерной форм С-реактивного белка в крови пациентов.
- Мономерная форма С-реактивного белка может играть не менее важную роль, чем нативная, в диагностике и течении сердечно-сосудистых патологий.

Цель

Разработка метода регистрации циркулирующего в крови мономера С-реактивного белка (СРБ), а также изучение уровней изоформ СРБ – нативного пентамера С-реактивного белка (нСРБ) и мономера С-реактивного белка (мСРБ) – в крови пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца (ИБС) и острым инфарктом миокарда.

Материалы и методы

Исследовали образцы плазмы крови, полученные от 14 пациентов с острым инфарктом миокарда на вторые – третьи сутки, 22 пациентов со стабильной ИБС и 11 здоровых добровольцев. Исследование проводили при помощи проточного цитофлуориметра FACS CantoII и набора функциональных частиц Cytometric Bead Array (BD Biosciences, США). Использовали моноклональные антитела к СРБ (клоны МОН328 и МОН372 «ИМТЕК», Россия; клон 8С8, (Sigma-Aldrich, США), поликлональные антитела к СРБ GAN-FITC («ИМТЕК»), нативный СРБ («ИМТЕК») и рекомбинантный мономерный СРБ (получен в дар от доктора L. Potempa).

Результаты

Разработана тест-система, позволившая определить уровень мономера СРБ в крови пациентов. У всех пациентов с ИБС зафиксирован повышенный уровень СРБ в плазме крови, в то время как в контрольной группе показатель был ниже определяемого порога. У пациентов со стабильной ИБС концентрация мСРБ составила 2,34 (1,42; 3,27) мкг/л, тогда как наиболее высокий уровень мСРБ отмечен у лиц с острым инфарктом миокарда – 16,76 (3,65; 54,83) мкг/л ($p = 0,0002$, критерий Краскела – Уоллиса ANOVA). Корреляции уровней мСРБ и показателей нСРБ, высокочувствительного С-реактивного белка и интерлейкина-6 не обнаружено.

Заключение

Новая тест-система, позволяющая определять уровень мономера С-реактивного белка в крови, делает возможным исследование роли мСРБ в патогенезе и течении ИБС. Полученные результаты позволяют утверждать, что мономер С-реактивного белка может играть не меньшую роль, чем его нативная форма, в диагностике и течении кардиологических патологий, а также иных, связанных с воспалительными процессами в организме, заболеваний.

Ключевые слова

Ишемическая болезнь сердца • С-реактивный белок • Мономерный С-реактивный белок • Острый инфаркт миокарда

Поступила в редакцию: 03.04.2020; поступила после доработки: 21.04.2020; принята к печати: 04.05.2020

MONOMERIC C-REACTIVE PROTEIN IN CORONARY ARTERY DISEASE

M.D. Zvereva ✉, O.S. Saburova, I.S. Melnikov, S.G. Kozlov, Z.A. Gabbasov

National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 15a, 3d Cherepkovskaya St., Moscow, Russian Federation, 121552

Highlights

- A unique laboratory kit for measuring native and monomeric C-reactive protein in blood levels has been developed.

Для корреспонденции: Мария Дмитриевна Зверева, zverevamd23@gmail.com; адрес: ул. 3-я Черепковская, 15а, Москва, Россия, 121552

Corresponding author: Maria D. Zvereva, zverevamd23@gmail.com; address: 15a, 3d Cherepkovskaya St., Moscow, Russian Federation, 121552

- Obtained data suggest that monomeric C-reactive protein can play no less important role than native C-reactive protein in the diagnosis and progress of cardiovascular diseases.

Aim	To develop a method for measuring circulating monomeric C-reactive protein and to determine the levels of C-reactive protein isoforms (native pentameric C-reactive protein and monomeric C-reactive protein) in patients with stable coronary artery diseases and acute myocardial infarction.
Methods	Plasma and blood serum samples were collected from 22 patients with stable coronary artery disease (CAD), 14 patients with acute myocardial infarction at days 2-3, and 11 healthy volunteers. The analysis was performed using flow cytometry FACS CantoII and a set of functional particles Cytometric Bead Array (BD Biosciences, USA). Antibodies for CRP (clones 328 and 372 from ImTek, Russia, and clone 8C8 from Sigma-Aldrich, USA), rCRP-GAH (with antibodies for CRP), native CRP (ImTek, Russia) and recombinant monomeric CRP (received as a gift from Dr. L. Potempa) were used in the analysis.
Results	A novel laboratory kit for measuring blood levels of monomeric CRP has been developed. Patients with CAD demonstrated elevated plasma levels of CRP, whereas healthy subjects reported the levels below the lower cut-off. Patients with stable CAD had mCRP concentration of 2.34 (1.42; 3.27) $\mu\text{g/L}$, whereas patients with acute MI had the highest level of 16.76 (3.65; 54.83) $\mu\text{g/L}$ ($p = 0.0002$, Kruskal–Wallis One Way Anova). There were no any correlations between mCRP levels and nCRP, hs-CRP and IL-6.
Conclusion	The novel laboratory kit allows measuring monomeric C-reactive protein and provides novel data on the role of mCRP in the development and progress of CAD. Obtained data suggest that monomeric C-reactive protein can play no less important role than native C-reactive protein in the diagnosis and progress of cardiovascular diseases as well as other diseases associated with the inflammatory process.
Keywords	Coronary artery disease • C-reactive protein • mCRP • Acute myocardial infarction

Received: 03.04.2020; received in revised form: 21.04.2020; accepted: 04.05.2020

Список сокращений

ИБС – ишемическая болезнь сердца	нСРБ – нативный пентамер С-реактивного белка
ИМ – инфаркт миокарда	мСРБ – мономер С-реактивного белка
СРБ – С-реактивный белок	

Введение

С-реактивный белок (СРБ) является филогенетически высококонсервативным белком плазмы с гомологами у позвоночных и многих беспозвоночных, который участвует в системном ответе на воспаление. В настоящее время представлено значительное количество данных о связи СРБ с сердечно-сосудистыми заболеваниями, такими как артериальная гипертензия и ишемическая болезнь сердца (ИБС), а также нарушениями метаболизма глюкозы и липидов [1]. Длительное время велись дискуссии о том, является ли СРБ только биомаркером развития сердечно-сосудистых осложнений, не принимающим непосредственного участия в инициации и поддержании воспалительного процесса, или он вовлечен в патогенез воспаления.

Данные многочисленных исследований, накопленные за десятилетия изучения СРБ, были противоречивыми [2]. Тем не менее к настоящему моменту достаточно доказательств того, что проти-

воречия в результатах ранее проведенных исследований, вероятно, связаны с тем, что СРБ имеет две изоформы. Одна из них, наиболее изученная, – нативная – состоит из пяти нековалентно связанных идентичных субъединиц с молекулярным весом около 23 кДа. Относится к семейству пентраксинов и синтезируется в печени в условиях воспалительной активации интерлейкином-6. Другая изоформа – мономерная – образуется в зоне воспаления в результате диссоциации нативной изоформы.

Показано, что нативный С-реактивный белок (нСРБ) может необратимо диссоциировать в местах воспаления и инфекции на пять отдельных мономеров СРБ (мСРБ). Быстрая диссоциация СРБ в мономер происходит на поверхности активированных тромбоцитов, микрочастиц клеточного происхождения и при связывании с мембранами поврежденных или апоптотических клеток. Также есть вероятность, что некоторые клетки крови способны самостоятельно продуцировать мономерную

форму СРБ [3]. Ввиду структурных особенностей данные формы СРБ могут по-разному влиять как на скорость, так и пути активации воспалительных процессов в организме.

Накопленные данные позволяют утверждать, что в то время как нативная изоформа, определяемая антителами к высокочувствительному СРБ, не участвует в воспалительном процессе, мономерная изоформа С-реактивного белка может играть непосредственную роль в развитии острого и поддержании хронического воспалительного ответа. Например, имеются данные о том, что мСРБ, в отличие от нСРБ, может активировать нейтрофилы, моноциты и тромбоциты, что способствует стимуляции их провоспалительной активности [4].

Нативный СРБ находит все большее применение как значимый биомаркер риска неблагоприятных сердечно-сосудистых событий при атеросклерозе, сопоставимый по эффективности с холестерином и его фракциями. На основании полученных данных Центр контроля и профилактики заболеваний Американской ассоциации сердца отнес нСРБ к независимым биомаркерам сердечно-сосудистого риска [5]. При этом данных о роли мСРБ в патогенезе ишемической болезни сердца немного. Кроме того, отсутствуют унифицированные методы определения и доступные тест-системы определения в крови уровня мСРБ.

В связи с этим целями настоящего исследования были разработка метода регистрации циркулирующего в крови мономера СРБ, а также изучение уровней изоформ СРБ (нСРБ и мСРБ) в крови пациентов со стабильной ИБС и инфарктом миокарда.

Материалы и методы

Пациенты

В исследование включены 22 пациента мужского и женского пола в возрасте от 45 до 75 (в среднем $62,5 \pm 11,7$) лет с хронической ИБС и 14 пациентов с инфарктом миокарда (ИМ) в возрасте 60 ± 14 лет. Критериями исключения являлись возраст (>75 лет); нестабильная стенокардия; инфаркт миокарда, перенесенный в течение 60 дней до включения пациента в исследование; коронарное шунтирование, баллонная ангиопластика или стентирование коронарных артерий в анамнезе; сердечная недостаточность со снижением фракции выброса менее 40%; уровень креатинина в сыворотке крови более 150 мкмоль/л; тяжелая коморбидность. Пациенты получали 100 мг ацетилсалициловой кислоты и 75 мг клопидогрела в сутки. Всем пациентам, как с острой, так и хронической ИБС, назначалась липидоснижающая терапия статинами. Антиангинальные и гипотензивные препараты применялись по решению лечащего врача.

Кровь больных с ИМ собирали на 2–3-е сут. после развития ИМ. Больные получали в качестве ан-

титромбоцитарной терапии аспирин (1-е сут. – 300 мг, затем – 100 мг/сут.) и клопидогрел (1-е сут. – 600 мг, затем – 75 мг/сут.).

Группу контроля составили 11 практически здоровых добровольцев в возрасте от 30 до 55 лет.

Информация и соблюдение этических норм при проведении исследования

Исследование соответствует стандартам надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice) и принципам Хельсинкской декларации, одобрено локальным этическим комитетом учреждения. Все пациенты ознакомлены с целями и основными положениями исследования, подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Подготовка образцов крови

Кровь получена у пациентов со стабильной ИБС и больных, имеющих в анамнезе острый инфаркт миокарда до третьих суток. Также кровь забиралась у людей без системных воспалительных заболеваний для создания контрольной группы. Забор крови выполнен в утренние часы в пробирки S-Monovette (Sarstedt, Германия) с 3,2% цитратом натрия при соотношении крови к антикоагулянту 1:9. Кровь центрифугировали на скорости 10 000 об./мин (2000 g) в течение 20 минут. Полученный супернатант отбирали в отдельные пробирки типа «Эппендорф» и хранили при -40°C .

Создание мультиплексной системы анализа

Измерительная система для определения в крови уровней нСРБ и мСРБ создана на основе набора функциональных частиц Cytometric Bead Array (BD Biosciences, США). В основе этого набора лежит методика ковалентного связывания водорастворимых антител к целевым белкам с поверхностью цветных функциональных шариков. Связь между шариком и антителами формируется с использованием sulfo-SMCC (Sigma-Aldrich, США). После того как функциональные шарики добавляют в исследуемый образец плазмы крови, антитела на их поверхности связывают свой белок-лиганд. Затем в образец помещают вторые (проявляющие) антитела к этому целевому белку, которые мечены флуорохромом, флуоресценция которого отличается от флуоресценции функциональных частиц. Интенсивность флуоресценции конъюгированных с шариками вторых антител используется для определения уровня связывания целевого белка с шариками и определения его концентрации в образце крови.

Мы конъюгировали с различными антителами к СРБ функциональные шарики А5, С4 и Е5 из набора Cytometric Bead Array, которые были одного размера, но разной интенсивности флуоресценции по флуорохрому APC-Cy7. Частицы конъюгированы с различными мышинными моноклональными

антителами к СРБ: А5 – с антителами клона МОН328 («ИМТЕК», Россия), Е5 – с антителами клона МОН372 («ИМТЕК», Россия) и С4 – с антителами клона 8С8 (Sigma-Aldrich, США). Для выявления уровня связывания растворимого анализита с функциональными частицами в качестве проявляющих антител использовали FITC-конъюгированные поликлональные козьи антитела к СРБ – GAN-FITC («ИМТЕК», Россия).

Статистический анализ

Значения нормального распределения выражены как среднее \pm стандартное отклонение (Mean \pm SD), значения с асимметричным распределением – через медиану (верхний и нижний квартили). Для проверки гипотез, связанных с видом распределения, применен критерий Шапиро – Уилка. Сравнение данных двух групп проводилось непараметрическим крите-

рием Манна – Уитни, трех и более групп – критерием Краскела – Уоллиса ANOVA. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Статистический анализ выполнен с помощью программного пакета SPSS Statistics версии 23.0 (SPSS Inc., США).

Результаты

Измерение массовой концентрации мСРБ в образцах плазмы крови

Разработана оригинальная мультиплексная система иммуноанализа уровней мономерной и пентамерной изоформ СРБ в образцах крови с помощью функциональных шариков Cytometric Bead Array (BD Biosciences). Конъюгаты функциональных шариков (А5, Е5, С4) с различными антителами к СРБ человека (МОН372, МОН328, «ИМТЕК»; 8С8, Sigma-Aldrich) получали по методике конъюгирования с использованием Functional Bead Conjugation Buffer Set (BD Biosciences). Для выявления пентамерной (нативной) или мономерной изоформ СРБ человека проводили инкубирование полученных конъюгатов с белковыми образцами нСРБ (Sigma-Aldrich) и мСРБ (получен в дар от доктора L. Potempa) в концентрации 0,25 мкг/мл в течение часа при комнатной температуре. В качестве вторых антител, которые выявляют уровень связывания растворимого СРБ с функциональными шариками, использовали FITC-меченые поликлональные антитела козьи к СРБ человека GAN-FITC («ИМТЕК»).

На рис. 1А в виде диаграммы приведена интенсивность флуоресценции функциональных шариков А5, С4 и Е5 по каналу APC-Cy7. На рис. 1Б представлена гистограмма интенсивности флуоресценции функциональных шариков А5, С4 и Е5 по каналу FITC в присутствии проявляющих поликлональных антител к СРБ. В отсутствие СРБ образцы шариков обладают невысокой интенсивностью флуоресценции (MFI, Mean Fluorescence Intensity), равной 157, 112 и 82 RU для А5, С4 и Е5 соответственно.

На рис. 2 приведены результаты измерения на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD Biosciences) интенсивностей флуоресценции функциональных шариков А5, С4 и Е5 в присутствии в исследуемой пробе нативного и рекомбинантного мономерного СРБ в концентрации 0,25 мг/л и FITC-конъюгированных GAN-FITC поликлональных антител к СРБ человека. Результаты измерения показывают, что функциональные шарика А5 (гейт Р1) одинаково интенсивно связываются с обеими (нативной и мономерной) изоформами СРБ, в то время как шарика С4 (гейт Р2)

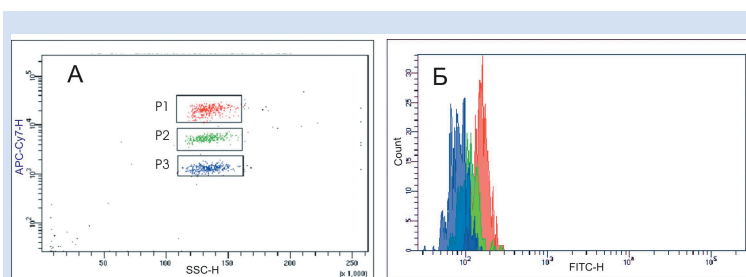


Рисунок 1. Интенсивность флуоресценции функциональных шариков А5, С4 и Е5 в каналах APC-Cy7 (А) и FITC в присутствии поликлональных FITC-меченых антител к С-реактивному белку (GAN-CRP-FITC) и отсутствие в анализируемом образце данного белка (Б)

Примечание: гейт Р1 – флуоресценция шариков А5; гейт Р2 – шариков С4; гейт Р3 – шариков Е5.

Figure 1. Fluorescence intensity of the functional beads А5, С4 and Е5 in APC-Cy7 channel (А) and FITC channel in presence of polyclonal FITC-labeled antibody to CRP (GAN-FITC) and absence of CRP in the solution (Б)
Note: Gate Р1 – the fluorescence of А5 beads; Gate Р2 – С4 beads; Gate Р3 – Е5 beads.

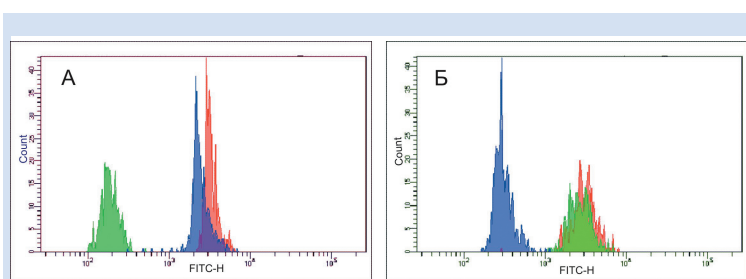


Рисунок 2. Гистограммы интенсивности флуоресценции функциональных шариков А5, С4 и Е5, конъюгированных с различными моноклональными антителами к С-реактивному белку (СРБ), в присутствии рекомбинантного мономерного (А) и нативного (Б) СРБ в концентрации 0,25 мг/л и FITC-меченых поликлональных антител GAN-FITC

Примечание: гейт Р1 – шарика А5, конъюгированные с клоном антител МОН328, «ИМТЕК»; гейт Р2 – шарика С4, конъюгированные с клоном антител 8С8, Sigma-Aldrich; гейт Р3 – шарика Е5, конъюгированные с антителами МОН372, «ИМТЕК».

Figure 2. Fluorescence intensity histograms of А5, С4 and Е5 beads, conjugated with different monoclonal antibodies to CRP, in presence of native (А) or recombinant monomeric (Б) CRP and FITC-labeled polyclonal antibody GAN-FITC in the solution

Note: Gate Р1 – А5 beads, conjugated with mAb clone МОН328, ImTek; Gate Р2 – С4 beads, conjugated with mAb clone 8С8, Sygma; Gate Р3 – Е5 beads, conjugated with mAb clone МОН372, ImTek. А) The fluorescence of functional beads in presence of 0.25 mg/l native CRP in the solution. Б) The fluorescence of functional beads in presence of 0.25 mg/l in the solution.

связываются в основном с мономерной, а E5 (гейт P3) – с нативной формой СРБ. MFI функциональных шариков A5 по каналу FITC составила 3261 и 3127 RU для нативной и мономерной изоформ СРБ соответственно. В то же время MFI для функциональных шариков C4 равнялась 188 и 2766 RU, а для E5 – 2486 и 313 RU соответственно. Таким образом, разработанная нами мультиплексная система позволяет одновременно определять общий уровень двух СРБ и в отдельности мономерной и пентамерной (нативной) изоформ в одном образце крови пациента.

На рис. 3 показан график определения концентрации мСРБ. Концентрация мСРБ оценивалась при помощи проточного цитофлуориметра FACS CantoII (BD Biosciences) по каналу FITC. Как видно, в этом канале шарики типа C4 дают интенсивное свечение. Данный график был построен при помощи метода последовательных разведений и калибровки. Рекombинантный мономерный СРБ известной концентрации, измеренной до этого в матричном растворе в мг/мл, последовательно разводился. Данная серия последовательных разведений помогла нам построить график зависимости C4-шариков, связывающих мСРБ, с интенсивностью флуоресценции FITC. Исходя из этого, мы можем говорить о том, что наблюдается рост концентрации мономерной формы, в то время как концентрация пентомерной нативной формы практически стабильно равна нулю.

Уровень мСРБ в образцах плазмы крови пациентов с ИБС

Разработанный нами мультиплексный метод измерения в плазме крови концентрации различных

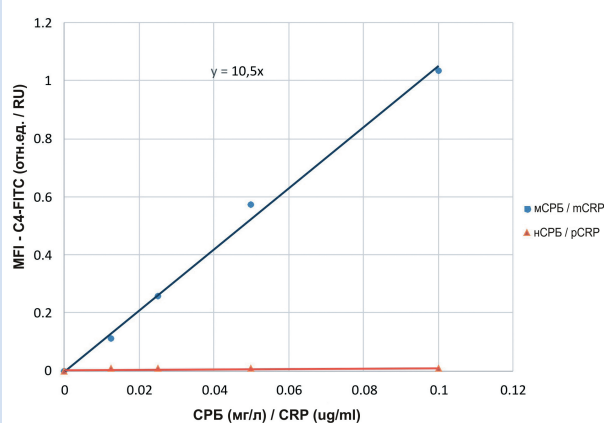


Рисунок 3. График зависимости интенсивности флуоресценции по каналу FITC шариков C4 от концентрации в растворе рекombинантного мономерного (мСРБ) и нативного С-реактивного белка (нСРБ)

Примечание: MFI – средняя интенсивность флуоресценции в канале FITC из шариков C4.

Figure 3. Dependence of the fluorescence intensity of C4 beads in the FITC channel with the concentration of recombinant mCRP and native CRP

Note: MFI – mean fluorescence intensity of C4 beads in the FITC channel.

изоформ СРБ использовался для изучения уровней СРБ в крови у пациентов с острым инфарктом миокарда ($n = 14$), со стабильной ИБС ($n = 22$) и здоровых добровольцев ($n = 11$). У всех здоровых добровольцев уровень мСРБ был ниже порога обнаружения, который в нашем исследовании составил 1,1 мкг/л. У пациентов со стабильной ИБС концентрация мСРБ составила 2,34 (1,42; 3,27) мкг/л, тогда как наиболее высокий уровень мСРБ отмечен у пациентов с острым инфарктом миокарда – 16,76 (3,65; 54,83) мкг/л ($p = 0,0002$, критерий Краскела – Уоллиса ANOVA) (рис. 4). Корреляция Спирмена между уровнями мСРБ, измеренного представленным в исследовании методом, и высокочувствительного СРБ, оцененного стандартным лабораторным методом у пациентов с ИБС, составила 0,16 ($p > 0,05$). Корреляции между уровнями мСРБ и показателями нСРБ и интерлейкина-6 также не обнаружено.

Обсуждение

Для определения концентрации мономера С-реактивного белка нами разработана оригинальная система на основе иммуноферментного анализа – широко известного лабораторного метода, построенного на принципе специфической реакции «антиген – антитело» и позволяющего определять различные низкомолекулярные соединения. Данный метод был усовершенствован и теперь может применяться для исследований на проточном цитофлуориметре. Разработанная система включает специальные шарики из набора BD Biosciences для измерения в проточном цитофлуориметре и FITC-метки, работающие по принципу «антиген – антитело». При использовании нового метода производится поштучная регистрация компонентов

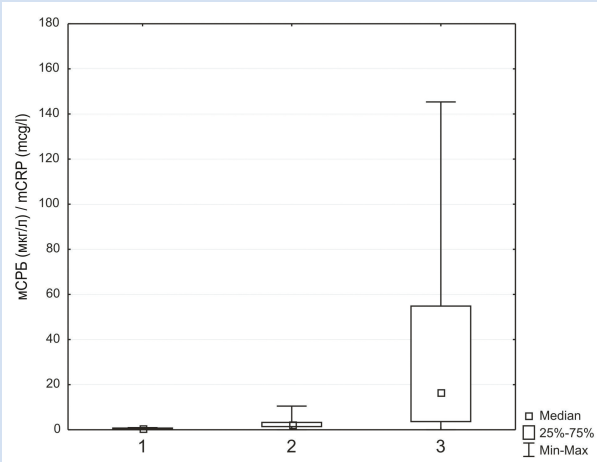


Рисунок 4. Уровни мономера С-реактивного белка (мСРБ) в крови здоровых добровольцев (1), пациентов со стабильной ишемической болезнью сердца (2) и пациентов с инфарктом миокарда (3)

Примечание: $p = 0,0002$, критерий Краскела – Уоллиса ANOVA.

Figure 4. mCRB blood levels in healthy volunteers (1), patients with stable CAD (2) and patients with MI (3).

Note: mCRB amounts are given in $\mu\text{g/l}$, $p = 0.0002$, Kruskal-Wallis One Way Anova.

анализируемой дисперсной среды по флуоресценции. Система имеет множество преимуществ в сравнении с классическим методом иммуноферментного анализа: более высокая скорость и точность, простота в исследовании при анализе и подсчете полученных данных, возможность исследования больших массивов данных и объективное измерение интенсивности флуоресценции.

Данная система имеет огромное значение для дальнейшего изучения мономера С-реактивного белка, так как мСРБ играет важную роль в развитии множества заболеваний. Отложение и локализация провоспалительных изоформ СРБ усиливают воспаление и повреждение тканей в широком спектре клинических состояний, включая ишемическую болезнь сердца, болезнь Альцгеймера, возрастную дегенерацию желтого пятна и иммунную тромбоцитопению [6]. Также сообщалось о большом разнообразии мономерных конформаций СРБ *in vitro* и *ex vivo*: от денатурированного мСРБ *in vitro*, продуцируемого высокими концентрациями мочевины [7], до восстановленного, связанного с мембраной мСРБ [8], и гибридного мСРБ с почти нативной структурой [9]. Высказано предположение, что связывание с микровезикулами приводит к структурным изменениям нСРБ, которые позволяют связывать C1q и, следовательно, активировать комплемент [10]. Таким образом, разработанный нами метод определения мСРБ может быть применен для дальнейшего исследования подобных вопросов.

Кроме того, все большее количество экспериментальных данных в литературе свидетельствует о провоспалительной роли мСРБ [11] и наличии связи между уровнями мСРБ и прогрессированием некоторых аутовоспалительных заболеваний в организме.

Ранее в литературе уже давались описания того, как мСРБ проявляет способность стимулировать выработку цитокинов и активировать выработку молекул адгезии, индуцировать образование и рост тромба, а также изменять свойства фибрина и экспрессию тканевого фактора. Считается, что циркулирующие микрочастицы, образующиеся из липидных мембран, могут не только вызывать диссоциацию нСРБ, но и действовать как элементы транспортировки мСРБ к участкам усиленного воспаления [12]. Также подчеркивалось, что стандартные клинические тесты определения СРБ, исполь-

зуемые в значительной части медицинских лабораторий, не способны обнаружить мСРБ, который связан с циркулирующими микрочастицами [13]. Такое разнообразие структурных свойств и особенностей мономера СРБ наглядно демонстрирует, насколько важно изучение данного типа белка.

Несмотря на то что в настоящее время указанный мономер считается преимущественно тканевой формой СРБ, мы можем определять его концентрацию и в циркулирующей крови. мСРБ может диссоциировать и затем распространяться в кровотоке в циркулирующих микрочастицах, что объясняет присутствие преимущественно мСРБ, связанного с тканями, в циркулирующей крови [14].

Ограничения

К ограничениям проведенного исследования относятся небольшой объем выборки исследуемых, а также отсутствие результатов проспективного наблюдения за пациентами со стабильной ИБС.

Заключение

Новая тест-система, позволяющая определять уровень мономера С-реактивного белка в крови, делает возможным исследование роли мСРБ в патогенезе и течении ИБС. Согласно результатам нашего исследования, мономер С-реактивного белка может играть не меньшую роль, чем его нативная форма, в развитии и последующем течении кардиологических патологий. Хотя первоначально мСРБ рассматривался как активатор комплемента и циркулирующий опсонин, все больше результатов исследований *in vivo* и *in vitro* свидетельствуют о том, что он играет более сложную роль в местных воспалительных ответах организма.

Конфликт интересов

М.Д. Зверева заявляет об отсутствии конфликта интересов. О.С. Сабурова заявляет об отсутствии конфликта интересов. И.С. Мельников заявляет об отсутствии конфликта интересов. С.Г. Козлов заявляет об отсутствии конфликта интересов. З.А. Габасов заявляет об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование

Авторы заявляют об отсутствии финансирования исследования.

Информация об авторах

Зверева Мария Дмитриевна, лаборант-исследователь федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация

Сабурова Ольга Стояновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»

Author Information Form

Zvereva Maria D., laboratory assistant at the National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation;

Saburova Olga S., PhD, leading researcher at the National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; ORCID 0000-0002-5702-9037

Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0002-5702-9037

Мельников Иван Сергеевич, младший научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-5241-3091

Козлов Сергей Геннадьевич, доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0001-8800-1670

Габбасов Зуфар Ахнафович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Российская Федерация; **ORCID** 0000-0003-3878-2573

Melnikov Ivan S., research assistant at the National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-5241-3091

Kozlov Sergey G., PhD, leading researcher at the National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0001-8800-1670

Gabbasov Zufar A., PhD, chief researcher at the National Medical Research Centre of Cardiology of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation; **ORCID** 0000-0003-3878-2573

Вклад авторов в статью

ЗМД – получение и анализ данных исследования, написание статьи, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

СОС – существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, получение, анализ и интерпретация данных исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

МИС – интерпретация данных исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

КСГ – интерпретация данных исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

ГЗА – существенный вклад в концепцию и дизайн исследования, внесение корректив в статью, утверждение окончательной версии для публикации, полная ответственность за содержание

Author Contribution Statement

ZMD – data collection and analysis, manuscript writing, approval of the final version, fully responsible for the content

SOS – significant contribution to the concept and design of the study, data collection, analysis and interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

MIS – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

KSG – data interpretation, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

GZA – significant contribution to the concept and design of the study, editing, approval of the final version, fully responsible for the content

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Титов В.Н., Ощепкова Е.В., Дмитриев В.А. С-реактивный белок, микроальбуминурия, эндогенное воспаление и артериальная гипертензия. М.: ППП «Типография «Наука», 2009.
2. Сумарков А. Б., Наумов В. Г., Масенко В. П. С-реактивный белок и сердечно-сосудистая патология. Тверь: Триада, 2006.
3. Melnikov I.S., Kozlov S.G., Saburova O.S., Avtaeva Y.N., Prokofieva L.V., Gabbasov Z.A. Current Position on the Role of Monomeric C-reactive Protein in Vascular Pathology and Atherothrombosis. *Curr Pharm Des.* 2020; 26(1): 37-43. doi: 10.2174/1381612825666191216144055.
4. Slevin M., Matou-Nasri S., Turu M., Luque A., Rovira N., Badimon L., et al. Modified C-reactive protein is expressed by stroke neovessels and is a potent activator of angiogenesis in vitro. *Brain Pathology.* 2010;20(1):151–165. doi: 0.1111/j.1750-3639.2008.00256.x.
5. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O., Criqui M., et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511.

doi: 10.1161/01.cir.0000052939.59093.45.

6. McFadyen J.D., Zeller J., Potempa L.A., Pietersz G.A., Eisenhardt S.U., Peter K. (2020) C-Reactive Protein and Its Structural Isoforms: An Evolutionary Conserved Marker and Central Player in Inflammatory Diseases and Beyond. In: Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins eds. Hoeger U., Harris J. Springer Nature, 2020. p. 499-520. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_20

7. Potempa L.A., Maldonado B.A., Laurent P., Zemel E.S., Gewurz H. Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol Immunol.* 1983; 20(11):1165-75. doi: 10.1016/0161-5890(83)90140-2

8. Wang M.Y., Ji S.R., Bai C.J., El Kebir D., Li H.Y., Shi J.M., Zhu W., Costantino S., Zhou H.H., Potempa L.A., Zhao J., Filep J.G., Wu Y. A redox switch in C-reactive protein modulates activation of endothelial cells. *FASEB J.* 2011; 25(9): 3186-96. doi: 10.1096/fj.11-182741

9. Lv J.M., Wang M.Y. In vitro generation and bioactivity evaluation of C-reactive protein intermediate. *PLoS One.* 2018; 13(5): e0198375. doi: 10.1371/journal.pone.0198375.

10. Braig D., Nero T.L., Koch H.G., Kaiser B., Wang X.,

Thiele J.R., Morton C.J., Zeller J., Kiefer J., Potempa L.A., Mellett N.A., Miles L.A., Du X.J., Meikle P.J., Huber-Lang M., Stark G.B., Parker M.W., Peter K., Eisenhardt S.U. Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites. *Nat Commun.* 2017; 8:14188. doi: 10.1038/ncomms14188

11. Thiele J.R., Habersberger J., Braig D., Schmidt Y., Goerendt K., Maurer V., Bannasch H., Scheichl A., Woollard K.J., von Dobschütz E., Kolodgie F., Virmani R., Stark G.B., Peter K., Eisenhardt S.U. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein localizes and aggravates inflammation: in vivo proof of a powerful proinflammatory mechanism and a new anti-inflammatory strategy. *Circulation.* 2014; 130(1): 35-50. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007124.

12. Habersberger J., Strang F., Scheichl A., Htun N., Bassler N., Merivirta R.M., Diehl P., Krippner G., Meikle P., Eisenhardt

S.U., Meredith I., Peter K. Circulating microparticles generate and transport monomeric C-reactive protein in patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2012; 96(1): 64-72. doi: 10.1093/cvr/cvs237.

13. Williams R.D., Moran J.A., Fryer A.A., Littlejohn J.R., Williams H.M., Greenhough T.J., Shrive A.K. Monomeric C-Reactive Protein in Serum With Markedly Elevated CRP Levels Shares Common Calcium-Dependent Ligand Binding Properties With an in vitro Dissociated Form of C-Reactive Protein. *Front. Immunol.* 2020; 11: 115. doi: 10.3389/fimmu.2020.00115.

14. Habersberger J., Strang F., Scheichl A., Htun N., Bassler N., Merivirta R.M. et al. Circulating microparticles generate and transport monomeric C-reactive protein in patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2012; 96(1): 64-72. doi: 10.1093/cvr/cvs237.

REFERENCES

1. Titov V.N., Oshchepkova E.V., Dmitriev V.A. S-реактивный белок, микроалбуминурия, эндогенное воспаление и артериальная гипертония. Moscow, 2009. (In Russian)

2. Sumarkov A. B., Naumov V. G., Masenko V. P. S-реактивный белок и сердечно-сосудистая патология. Tver', 2006. (In Russian)

3. Melnikov I.S., Kozlov S.G., Saburova O.S., Avtaeva Y.N., Prokofieva L.V., Gabbasov Z.A. Current Position on the Role of Monomeric C-reactive Protein in Vascular Pathology and Atherothrombosis. *Curr Pharm Des.* 2020; 26(1): 37-43. doi: 10.2174/1381612825666191216144055.

4. Slevin M., Matou-Nasri S., Turu M., Luque A., Rovira N., Badimon L., et al. Modified C-reactive protein is expressed by stroke neovessels and is a potent activator of angiogenesis in vitro. *Brain Pathology.* 2010;20(1):151–165. doi: 0.1111/j.1750-3639.2008.00256.x.

5. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W., Anderson J.L., Cannon R.O., Criqui M., et al. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association. *Circulation* 2003;107:499-511. doi: 10.1161/01.cir.0000052939.59093.45.

6. McFadyen J.D., Zeller J., Potempa L.A., Pietersz G.A., Eisenhardt S.U., Peter K. (2020) C-Reactive Protein and Its Structural Isoforms: An Evolutionary Conserved Marker and Central Player in Inflammatory Diseases and Beyond. In: Vertebrate and Invertebrate Respiratory Proteins, Lipoproteins and other Body Fluid Proteins eds. Hoeger U., Harris J. Springer Nature, 2020. p. 499-520. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-41769-7_20

7. Potempa L.A., Maldonado B.A., Laurent P., Zemel E.S., Gewurz H. Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium. *Mol Immunol.* 1983; 20(11):1165-75. doi: 10.1016/0161-5890(83)90140-2

8. Wang M.Y., Ji S.R., Bai C.J., El Kebir D., Li H.Y., Shi J.M., Zhu W., Costantino S., Zhou H.H., Potempa L.A., Zhao J., Filep J.G., Wu Y. A redox switch in C-reactive protein modulates

activation of endothelial cells. *FASEB J.* 2011; 25(9): 3186-96. doi: 10.1096/fj.11-182741

9. Lv J.M., Wang M.Y. In vitro generation and bioactivity evaluation of C-reactive protein intermediate. *PLoS One.* 2018; 13(5): e0198375. doi: 10.1371/journal.pone.0198375.

10. Braig D., Nero T.L., Koch H.G., Kaiser B., Wang X., Thiele J.R., Morton C.J., Zeller J., Kiefer J., Potempa L.A., Mellett N.A., Miles L.A., Du X.J., Meikle P.J., Huber-Lang M., Stark G.B., Parker M.W., Peter K., Eisenhardt S.U. Transitional changes in the CRP structure lead to the exposure of proinflammatory binding sites. *Nat Commun.* 2017; 8:14188. doi: 10.1038/ncomms14188

11. Thiele J.R., Habersberger J., Braig D., Schmidt Y., Goerendt K., Maurer V., Bannasch H., Scheichl A., Woollard K.J., von Dobschütz E., Kolodgie F., Virmani R., Stark G.B., Peter K., Eisenhardt S.U. Dissociation of pentameric to monomeric C-reactive protein localizes and aggravates inflammation: in vivo proof of a powerful proinflammatory mechanism and a new anti-inflammatory strategy. *Circulation.* 2014; 130(1): 35-50. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007124.

12. Habersberger J., Strang F., Scheichl A., Htun N., Bassler N., Merivirta R.M., Diehl P., Krippner G., Meikle P., Eisenhardt S.U., Meredith I., Peter K. Circulating microparticles generate and transport monomeric C-reactive protein in patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2012; 96(1): 64-72. doi: 10.1093/cvr/cvs237.

13. Williams R.D., Moran J.A., Fryer A.A., Littlejohn J.R., Williams H.M., Greenhough T.J., Shrive A.K. Monomeric C-Reactive Protein in Serum With Markedly Elevated CRP Levels Shares Common Calcium-Dependent Ligand Binding Properties With an in vitro Dissociated Form of C-Reactive Protein. *Front. Immunol.* 2020; 11: 115. doi: 10.3389/fimmu.2020.00115.

14. Habersberger J., Strang F., Scheichl A., Htun N., Bassler N., Merivirta R.M. et al. Circulating microparticles generate and transport monomeric C-reactive protein in patients with myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 2012; 96(1): 64-72. doi: 10.1093/cvr/cvs237.

Для цитирования: М.Д. Зверева, О.С. Сабурова, И.С. Мельников, С.Г. Козлов, З.А. Габбасов. Современные возможности определения и применения в клинике мономера С-реактивного белка. Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2020; 9 (2): 45-52. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-45-52

To cite: M.D. Zvereva, O.S. Saburova, I.S. Melnikov, S.G. Kozlov, Z.A. Gabbasov. Monomeric C-reactive protein in coronary artery disease. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2020; 9 (2): 45-52. DOI: 10.17802/2306-1278-2020-9-2-45-52